



Original

Efecto inhibitorio del dietilestilbestrol sobre aislamientos clínicos de *Candida albicans* sensibles y resistentes a los azoles

Milagros Muthular^a, Pablo Passero^a, Fernanda Bálsamo^b, Virginia Jewtuchowicz^c, Valeria Miozza^a, María Isabel Brusca^d y Cristina Pérez^{a,*}

^a Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

^b Radiología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

^c Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

^d Microbiología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 7 de abril de 2018

Aceptado el 29 de marzo de 2019

On-line el 9 de julio de 2019

Palabras clave:

Antimicóticos
Candida albicans
Dietilestilbestrol

R E S U M E N

Antecedentes: *Candida albicans* es uno de los microorganismos más frecuentemente involucrados en diversas infecciones; la cavidad bucal del paciente, los nichos de caries o la enfermedad periodontal pueden actuar en ocasiones como reservorio. El desarrollo de resistencia a los medicamentos disponibles y otros factores justifican la búsqueda de nuevos antimicóticos.

Objetivos: Estudiar de forma comparativa los efectos *in vitro* del medicamento antitumoral dietilestilbestrol (DES) y del fluconazol (FLZ) sobre el crecimiento de cepas clínicas de *C. albicans* aisladas de pacientes con enfermedades odontológicas y médicas.

Métodos: Se emplearon siete cepas de *C. albicans*: a) la cepa de colección ATCC 90028, sensible a FLZ (ATCC); b) cuatro aislamientos bucales de sendas pacientes oncológicas con enfermedad periodontal (period 8, 9, 10 y 11); y c) dos aislamientos bucales de un paciente con sida y candidiasis orofaríngea: un aislamiento era sensible a FLZ (2-76) y el otro resistente (12-99). Se evaluó el crecimiento celular por técnicas espectrofotométricas estandarizadas (M27-A3, CLSI) y se calculó la concentración inhibitoria 50% (CI₅₀) por análisis de funciones mediante el programa Graph Pad.

Resultados: El DES inhibió el crecimiento de *C. albicans*, tanto sensible como resistente al FLZ. Los datos se ajustan adecuadamente a curvas teóricas saturables de tipo concentración del inhibidor *versus* respuesta. Las concentraciones inhibitorias mínimas fueron con DES y FLZ, respectivamente, las siguientes: 28,18 µg/ml y 4,90 µg/ml (ATCC); 17,16 µg/ml y 3,14 µg/ml (period); 27,64 µg/ml y 4,22 µg/ml (2-76); 6,16 µg/ml y 438,19 µg/ml (12-99).

Conclusiones: El DES tiene actividad antimicótica sobre aislamientos de *C. albicans* de pacientes con enfermedades odontológicas y médicas. La mayor potencia antimicótica observada fue sobre el aislamiento resistente al FLZ.

© 2019 Asociación Española de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Inhibitory effect of diethylstilbestrol on clinical strains of *Candida albicans* susceptible and resistant to azoles

A B S T R A C T

Keywords:

Antifungals
Candida albicans
Diethylstilboestrol

Background: *Candida albicans* is a microorganism frequently involved in several infections; the patient's oral cavity, caries niches or periodontal disease can sometimes be the reservoir. The fungal resistance to the available treatments, among other reasons, has led to the search for new antifungal alternatives.

Aims: To carry out a comparative study of the *in vitro* effects of diethylstilboestrol (DES) and fluconazole (FLZ) on the growth of clinical strains of *C. albicans*.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cristina.perez@odontologia.uba.ar (C. Pérez).

Methods: Seven strains of *C. albicans* were used: a) one FLZ-sensitive culture collection strain, ATCC 90028 (ATCC); b) four oral isolates from four oncological patients with periodontal disease (period 8, 9, 10, and 11); and c) two oral isolates from an AIDS patient with oropharyngeal candidiasis: one FLZ-sensitive (2-76), and another FLZ-resistant (12-99). The MIC was evaluated by standard spectrophotometric techniques using the CLSI (M27-A3) guidelines. The inhibitory concentration 50% (IC₅₀) was calculated using functional analysis with the Graph Pad software.

Results: DES inhibited the growth of all *C. albicans* strains, whether sensitive or resistant to FLZ. Experimental data fitted non-linear functions of inhibitor concentration versus response. Minimum inhibitory concentrations (MIC) for DES and FLZ were as follows: 28.18 µg/ml and 4.90 µg/ml (ATCC); 17.16 µg/ml and 3.14 µg/ml (period); 27.64 µg/ml and 4.22 µg/ml (2-76); 6.16 µg/ml and 438.19 µg/ml (12-99), respectively.

Conclusions: DES showed antifungal activity on all clinical *C. albicans* strains isolated from patients with dental and medical diseases. It showed the highest potency on the FLZ-resistant isolate.

© 2019 Asociación Española de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Las infecciones fúngicas se han incrementado notablemente en las últimas décadas, particularmente en los pacientes inmunocomprometidos. *Candida albicans* es una de las especies más frecuentemente involucradas y, por su condición de oportunista, en tales pacientes coloniza y prolifera en distintos órganos y tejidos produciendo alteraciones patológicas. En la cavidad bucal, por ejemplo, contribuye al desarrollo de caries y enfermedad periodontal^{2,9,14}. Con respecto a la patogénesis de esta última, *C. albicans* tiene un papel preponderante entre otras especies de su género: la presencia de sus hifas ha sido demostrada en el tejido conectivo de pacientes periodontales, en asociación con bacterias anaerobias altamente invasivas como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *C. albicans* y *Candida dubliniensis* podrían formar parte de la placa microbiana periodontal, desempeñar un papel fundamental en la adherencia de la misma a los tejidos y, de esta forma, propiciar la invasión en profundidad^{10,20,21}.

El tratamiento farmacológico de las candidiasis incluye con frecuencia los antimicóticos azólicos. El desarrollo de resistencia a los mismos y otros factores justifican la búsqueda de nuevos compuestos. Algunos medicamentos antitumorales presentan también actividad antimicrobiana entre ellos el tamoxifeno, que actúa sobre cepas de *C. albicans* sensibles y resistentes a los azoles^{7,15}. Otro compuesto antitumoral ampliamente utilizado es el dietilestilbestrol (trans 3,4-bis[p-hidroxifenil]-3-hexeno) (DES). Se trata de un compuesto sintético no esteroide que actúa como agonista de los estrógenos uniéndose a los receptores de los mismos¹, y que se prescribía a las mujeres embarazadas entre los años 1940 y 1971 para prevenir abortos espontáneos, partos prematuros y otras complicaciones relacionadas con el embarazo. Posteriormente comenzó a utilizarse ampliamente para el tratamiento del cáncer de mama. Sin embargo, a raíz del descubrimiento de que, al igual que otros estrógenos, podía producir cáncer de útero y vagina tanto en mujeres adultas como en fetos, se prohibió su uso en mujeres¹⁹ y se reservó para el tratamiento del cáncer de próstata.

El adenocarcinoma prostático es el segundo tipo de tumor más diagnosticado en hombres; el 80-90% de los casos son andrógeno-dependientes en el diagnóstico inicial, y la ablación es el tratamiento primario. Las terapias tradicionales incluyen el uso de antagonistas del receptor de andrógenos, orquiectomía y/o castración química con fármacos moduladores de la hormona liberadora de hormona luteinizante, que bloquean la producción de andrógenos. Sin embargo, estos tratamientos se tornan ineficaces contra los tumores recurrentes o avanzados y, como alternativa, se han utilizado similares de estrógenos como el DES. Estos compuestos actuarían disminuyendo los niveles de testosterona al reducir la secreción de hormona luteinizante e incrementar la síntesis de proteínas fijadoras de hormonas sexuales y prolactina⁵.

Por otra parte, se ha demostrado que el DES tiene actividad *in vitro* sobre otros tipos de células tumorales. Así, modifica la entrada y salida de calcio de las mitocondrias de células cancerosas HeLa¹² y ejerce efectos regulatorios sobre la actividad mitocondrial de los melanocitos, involucrados en la síntesis de melanina y el cáncer de piel²⁴. En lo que respecta a su actividad antimicótica, el DES disminuye el consumo de oxígeno, medido por manómetros, durante la fase de crecimiento de *C. albicans*²⁸, además de inhibir la ATPasa de la membrana plasmática de cepas de *C. albicans*. Dicha enzima regularía varias funciones celulares vitales para la levadura²². Anteriormente se había observado que el DES inhibe la ATPasa mitocondrial de hígado de rata¹³.

Curiosamente, la bibliografía científica no abunda en datos relacionados con aislamientos de la cavidad bucal. En función de lo expuesto anteriormente, en este trabajo nos propusimos estudiar de forma comparativa los efectos del DES y del fluconazol (FLZ) sobre el crecimiento *in vitro* de aislamientos de *C. albicans* de pacientes con enfermedades odontogénicas y médicas.

Materiales y métodos

Microorganismos

Como microorganismo de referencia se usó una cepa de colección de *C. albicans* (ATCC 90028), cuya sensibilidad a los azoles fue tomada como referencia por Dolan et al.⁷. Como pacientes con enfermedades odontogénicas y complicaciones médicas se seleccionaron cuatro mujeres inmunocompetentes mayores de 18 años, con enfermedad periodontal no agresiva tratada mecánicamente y con diagnóstico reciente de cáncer de mama. Las pacientes, numeradas como 8, 9, 10 y 11 acudían al Centro Médico Austral para su terapia. De sus surcos gingivales se recuperaron sendos aislamientos de *C. albicans*, abreviados como period 8, 9, 10 y 11. También se evaluaron dos cepas orales aisladas de un paciente con sida y episodios recurrentes de candidiasis orofaríngea que requería dosis de FLZ cada vez mayores para controlar la infección; una dosis diaria de 800 mg de FLZ al día llegó a resultar insuficiente. Los dos aislamientos habían sido caracterizados^{26,27} y donados gentilmente por el Dr. T. White (Universidad de Washington, Seattle, EE. UU.); el aislamiento 2-76 era sensible a los azoles, mientras que el 12-99 era resistente a los mismos través de la sobreexpresión de los transportadores ABC cdr1, cdr2 y mdr1.

Compuestos

El DES (base anhidra, 99,6% pureza) fue suministrado por el Laboratorio Gobbi Novag S.A. (Wilde, Provincia de Buenos Aires,

Argentina); el FLZ (98% pureza) fue adquirido en Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO; EE. UU.).

Crecimiento de *Candida albicans*

El crecimiento celular se evaluó por la técnica de espectrofotometría estandarizada M27-A3 del CLSI⁶ descrita por Barceló et al.⁴. Se utilizó un inóculo inicial de $0,5-2,5 \times 10^3$ UFC/ml, ajustado a un valor de 0,5 de la escala McFarland. Se incluyeron concentraciones de DES y FLZ comprendidas entre 0 y 1.000 μM . Se midió la absorbancia a 540 nm tras incubación a 35 °C en microplacas de 96 pocillos.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de FLZ y DES es definida como la menor concentración capaz de producir una inhibición del crecimiento superior al 90% cuando se compara el pocillo con el compuesto con aquel sin el compuesto. En un espectrofotómetro su valor corresponde a la concentración correspondiente a una densidad óptica del 50% (CI_{50}) o menos con respecto a la del control de crecimiento en las condiciones descritas en la técnica.

Graficación y análisis estadístico

Se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.00 (GraphPad Software San Diego; CA, EE. UU.) para construir los gráficos y calcular los promedios y error estándar de los resultados provenientes de experimentos independientes realizados al menos por duplicado o triplicado. También se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos.

Resultados

Partiendo de una solución 20 mM de DES en dimetilsulfóxido (DMSO), y a los efectos de lograr la mínima proporción posible del solvente orgánico, se estudió la dilución del compuesto en distintas combinaciones de DMSO/agua. En los experimentos se utilizaron los solventes pertinentes en los controles.

Al igual que el FLZ, el DES inhibió el crecimiento de las distintas cepas de *C. albicans* en forma no lineal dependiente de la concentración. Los datos se ajustan adecuadamente a curvas teóricas de tipo concentración de inhibidor *versus* respuesta, según se infiere de los valores de los parámetros obtenidos con el programa Graph Pad para funciones matemáticas no lineales. Los datos obtenidos permiten estimar con mayor confiabilidad y precisión las curvas de saturación y los valores de concentración inhibitoria 50% (CI_{50}), equivalente a la CIM de los compuestos en las condiciones experimentales.

Las figuras 1 y 2 muestran los resultados con los aislamientos period 8 y 12-99, respectivamente. La CI_{50} de DES para el aislamiento period 8 fue 10,19 $\mu\text{g/ml}$; este valor fue de 6,17 $\mu\text{g/ml}$ para el aislamiento 12-99. Cabe señalar que todos los aislamientos periodontales mostraron resultados similares a los de period 8; estos valores se muestran promediados en la figura 3 y la tabla 1.

El FLZ, utilizado como tratamiento de referencia, inhibió el crecimiento de la cepa de colección ATCC 90028 con una CIM de $4,90 \pm 0,94 \mu\text{g/ml}$ ($16,00 \pm 3,06 \mu\text{M}$; fig. 3 B y tabla 1). En cambio, exhibió una CIM mucho mayor ($438,19 \pm 0,92 \mu\text{g/ml}$; $1432 \pm 3,00 \mu\text{M}$) sobre la cepa resistente 12-99 (fig. 2; tabla 1), en concordancia con trabajos anteriores de una parte de nuestro equipo¹⁶. El aislamiento period 8 exhibió una CI_{50} de 2,75 $\mu\text{g/ml}$ (9 μM) en el experimento, lo que indica que es sensible al FLZ.

Cabe destacar que el DES mostró una potencia 71 veces superior a la del FLZ sobre el aislamiento resistente a los azoles, mientras que en los aislamientos sensibles la potencia es menor que 1.

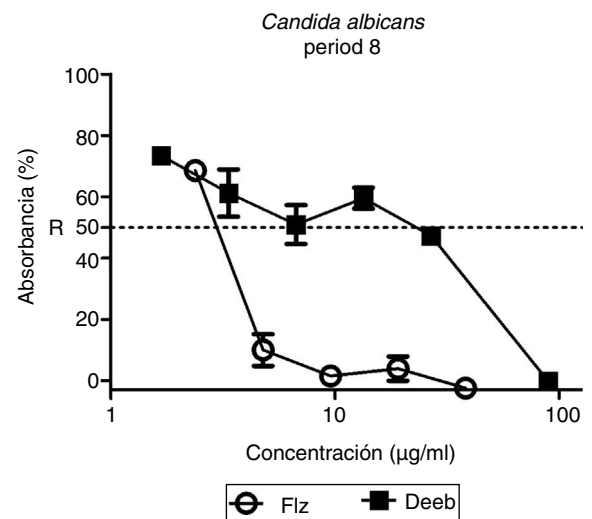


Figura 1. Efectos del DES y FLZ sobre el crecimiento de *C. albicans* period 8, sensible a azoles y aislada de una paciente con enfermedad periodontal y cáncer de mama (experimento realizado por triplicado o sextuplicado según la concentración utilizada). Los controles conducidos en ausencia de compuestos tienen un valor de absorbancia del 100%.

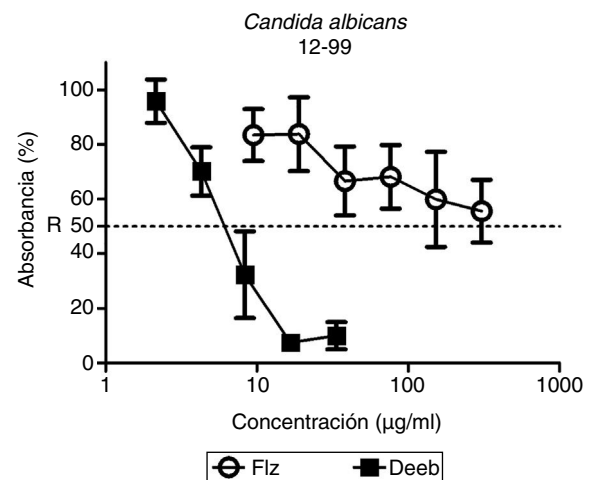


Figura 2. Efectos del DES y FLZ sobre el crecimiento de *C. albicans* 12-99, resistente a azoles y aislada de un paciente con candidiasis orofaríngea y sida (tres experimentos independientes realizados por triplicado). Los controles conducidos en ausencia de fármacos tienen un valor de absorbancia del 100%.

Discusión

C. albicans es un patógeno oportunista de la cavidad bucal que prolifera en pacientes que están inmunocomprometidos por distintas causas; la recurrencia de enfermedades orales que requieren tratamientos farmacológicos reiterados llevan, por ende, a desarrollar resistencia a los mismos. Los azoles figuran entre los antimicóticos más utilizados en el tratamiento de las candidiasis. Su uso prolongado y otros factores pueden conducir a la aparición de resistencias, lo que justifica la expansión de los estudios farmacológicos. Por otra parte, la bibliografía científica no abunda en datos relacionados con aislamientos de la cavidad bucal^{27,28}.

En nuestro estudio el DES inhibió el crecimiento de aislamientos orales de *C. albicans* de pacientes que padecían enfermedades odontogénicas y médicas graves: cuatro pacientes presentaban periodontitis y cáncer de mama, mientras que el quinto padecía sida y candidiasis recurrentes resistentes al FLZ. La actividad del DES contra la cepa de *C. albicans* 12-99, proveniente del quinto paciente, reviste particular relevancia debido a la resistencia del

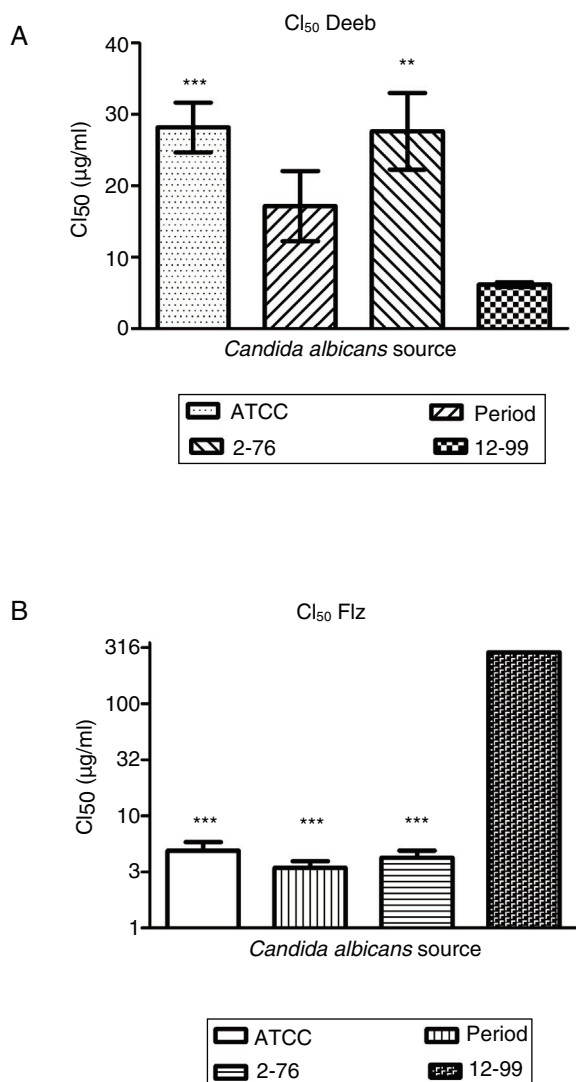


Figura 3. Concentración inhibitoria 50% (Cl_{50}) del DES (A) y FLZ (B) sobre aislamientos de *C. albicans* de distinto origen: ATCC 90028 (sensible a azoles) y aislamientos clínicos con distinta sensibilidad al FLZ. Se realizó un análisis estadístico mediante el test de Newman-Keuls para tres o más grupos y una vía de varianza. Se muestran las diferencias con respecto a la cepa resistente 12-99 ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$.

aislamiento mediada por bombas de eflujo, un mecanismo que puede estar presente en el 85% de los aislamientos de *Candida* provenientes de pacientes infectados por el VIH²⁷. El DES podría actuar inhibiendo las bombas de eflujo de los azoles, lo que aumentaría la concentración intracelular de tales fármacos y revertiría la resistencia a los mismos, como lo hace el 8 PP sobre los transportadores ABC *cdr*^{4,16}. Esta hipótesis debería ser probada experimentalmente. El hecho de que el DES actúe sobre cepas de *C. albicans*, tanto sensibles como resistentes a los azoles, podría ser

Tabla 1
 Cl_{50} del DES y FLZ para los distintos aislamientos de *C. albicans*. Se muestran los valores promedio, error estándar y número de experimentos independientes realizados (estos últimos entre paréntesis). En el caso de los aislamientos periodontales (8, 9, 10 y 11) se presenta el promedio de datos de los cuatro

	ATCC 90028	Aislamientos de pacientes con periodontitis y cáncer (8, 9, 10 y 11)	Aislamientos del paciente con candidiasis orofaríngea y sida	
			2-76	12-99
DES	28,18 ± 3,49 (3)	17,16 ± 4,92 (4)	27,64 ± 5,37 (2)	6,16 ± 0,31(3)
FLZ	4,90 ± 0,94 (3)	3,14 ± 0,73 (4)	4,22 ± 0,67 (2)	438,19 ± 0,92 (3)
Potencia DES/FLZ	0,17	0,18	0,15	71,13

explicado por su efecto inhibitorio común sobre la ATPasa de la membrana plasmática de ambas levaduras, según estudios previos de Shreaz et al.²². Tal enzima interviene en el balance hídrico celular, en el mantenimiento del equilibrio iónico y en la generación de la energía necesaria para transportar sustancias a través de la membrana celular²³. Al inhibir la bomba el DES podría provocar la consecuente reducción del flujo de hidrogeniones, hipótesis compatible con el descenso del pH intracelular con el eventual daño de la membrana celular que describieron Shreaz et al.²².

La disminución de la actividad mitocondrial podría estar involucrada en los efectos del DES sobre las cepas sensibles, de acuerdo a datos previos de Yotis y Haan²⁸. Sin embargo, nuestros estudios sobre viabilidad celular y estado metabólico mediante el método del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio no mostraron actividad del DES en concentraciones cercanas a su CIM en *C. albicans* 12-99, resistente a los azoles (datos no mostrados), lo cual sugiere que esta actividad mitocondrial no intervendría en su mecanismo de acción.

Nuestros datos amplían el abanico de efectos farmacológicos del DES, en consonancia con otros compuestos que comparten propiedades antimicrobianas y antitumorales, como el tamoxifeno⁷ y el flavonoide 2',4'-dihidroxi-5'-(1'',1''-dimetilalil)-8-prenilpinocembrina (8 PP), previamente estudiado por parte del equipo de investigación^{8,17}. De probarse su actividad *in vivo*, el DES podría emplearse como medicamento alternativo en pacientes que no responden al tratamiento clásico con azoles, o en tratamientos largos con otros antitumorales como el tamoxifeno (datos no mostrados, en vías de publicación). Si bien los efectos adversos de los estrógenos en general, y los reportados para el DES en particular, restringirían su indicación terapéutica para determinados grupos poblacionales, queda aún pendiente el desarrollo de nuevos ensayos que continúen la evaluación de su eficacia antimicótica y permitan reducir la aparición de efectos adversos. En este contexto se podría explorar su potencial aplicación restringida a los varones, ya que en las mujeres está prohibido por ser potencialmente cancerígeno¹⁹. De hecho, es utilizado para el tratamiento del cáncer de próstata. A tales efectos se usan dosis de 1 a 3 mg por vía oral, debido a que permiten alcanzar la mejor eficacia terapéutica con la menor tasa de efectos tromboembólicos y/o cardiovasculares^{5,18}. Las concentraciones alcanzadas son 21-22 nM (6×10^{-3} µg/ml aproximadamente)¹¹, y no llegan al valor CIM de 23 a 100 µM (6 a 27 µg/ml), que por otra parte resultaría tóxica en el caso de alcanzarse dicha concentración en sangre²⁹. Sin embargo, podría darse el caso de que el fármaco se concentrara en los tejidos de la biofase con una buena relación beneficio/riesgo, como ocurre con los antibióticos macrólidos y tetraciclinas. Se necesitarían datos farmacocinéticos y farmacodinámicos a fin de dilucidar esta hipótesis. De cualquier forma, y considerando que las dosis terapéuticas que ocasionaron patologías oncológicas adversas fueron más elevadas¹⁹, y que sus mayores efectos adversos sistémicos podrían soslayarse mediante la aplicación local del fármaco, se podría explorar la posibilidad de su uso como antimicótico mediante la aplicación tópica, reduciendo así los efectos adversos sistémicos, como ha ocurrido con el agente antitumoral tamoxifeno en el tratamiento de la leishmaniasis²⁵. Dado que el tratamiento

farmacológico en odontología es habitualmente local, juzgamos interesante estudiar esta vía en relación con su eficacia y reacciones adversas. De probarse su actividad e inocuidad *in vivo* el DES podría emplearse como medicamento alternativo en pacientes que no respondieran al tratamiento clásico con azoles. Los resultados ameritarían la continuación de estudios farmacológicos, habida cuenta de que el DES ya está aprobado como medicamento para otros usos terapéuticos.

Financiación

Universidad de Buenos Aires, Facultades de Odontología y de Medicina.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos al Prof. Titular Dr. J. C. Elverdin el préstamo del espectrofotómetro de la Cátedra de Fisiología de la FOUBA.

Bibliografía

- Amado JA, Flórez J. Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales. En: Florez J, editor. Farmacología humana (6.^a ed.). S.A. Barcelona, España; 2014.
- Ardila Medina CM, López Gaviria ME, Guzmán Zuluaga IC. Prevalencia de *Candida* y asociación con periodontopatógenos presentes en placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica. *Av Periodon Implantol*. 2014;26:129–34.
- Barceló S, Peralta MA, Ortega MG, Cabrera JL, Pérez C. Interacciones moleculares de un flavonoide prenilado con transportadores de antimicóticos dependientes de ATP. *Rev Fac Odon UBA*. 2014;29:26–36.
- Barceló S, Peralta M, Calise M, Finck S, Ortega G, Diez R, et al. Interactions of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* with fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*. *Phytomedicine*. 2017;32:24–9.
- Bosset PO, Albiges L, Seisen T, de la Motte Rouge T, Phé V, Bitker MO, et al. Current role of diethylstilbestrol in the management of advanced prostate cancer. *BJU Int*. 2012. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1464-410X.11206.x>. PMID: Dec 110 (11 Pt C): E826–E829, doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11206.x. PMID: 22578092.
- Clinical and laboratory standards institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testings of yeasts. Approved standard-M27-A3, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Dolan K, Montgomery S, Buchheit B, Didone L, Wellington M, Krysan D. Antifungal activity of tamoxifen: In vitro and in vivo activities and mechanistic characterization. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:3337–46.
- Elingold I, Isollabella MP, Casanova M, Celentano AM, Pérez C, Cabrera JL, et al. Mitochondrial toxicity and antioxidant activity of a prenylated flavonoid isolated from *Dalea elegans*. *Chem Biol Interac*. 2008;171:294–305.
- Gutiérrez Acero D, Alós Cortés L, García Gómez F, González Sanz A. Microbiología de la caries radicular en el paciente mayor. *Av Odontostomatol*. 2006;22:125–30.
- Jewtuchowicz VM, Mujica MT, Brusca MI, Sordelli N, Malzone MC, Pola SJ, et al. Phenotypic and genotypic identification of *Candida dubliniensis* from subgingival sites in immunocompetent subjects in Argentina. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23:505–9.
- Kemp HA, Read GF, Riad-Fahmy D, Pike AW, Gaskell SJ, Queen K, et al. Measurement of diethylstilbestrol in plasma from patients with cancer of the prostate. *Cancer Res*. 1981;41:4693–7.
- Lobatón CD, Vay L, Hernández San Miguel E, Santo Domingo J, Moreno A, Montero M, et al. Modulation of mitochondrial Ca²⁺ uptake by estrogen receptor agonists and antagonists. *Br J Pharm*. 2005;145:862–71.
- McEnery MW, Pedersen PL. Diethylstilbestrol. A novel F₀-directed probe of the mitochondrial proton ATPase. *J Biol Chem*. 1986;261:1745–52.
- Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* and the human mouth: A sticky situation. *PLOS Pathog*. 2013;9:e1003616. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003616>. PMID: 24146611- PMCID: PMC3798555.
- Passero P, Barceló S, Bálsamo F, Jewtuchowicz V, Brusca MI, Pérez C. El tamoxifeno inhibe el crecimiento de *Candida albicans* resistente a azoles. IX international symposium on natural product chemistry and applications. Termas de Chillán, Chile. 2016.
- Peralta MA, Calise M, Fornari MC, Ortega MG, Diez RA, Cabreba JL, et al. A prenylated flavanone from *Dalea elegans* inhibits rhodamine 6 G efflux and reverses fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Planta Med*. 2012;78:981–7.
- Pérez C, Tiraboschi IN, Ortega MG, Agnese AM, Cabrera JL. Further antimicrobial studies of 2' 4'-dihydroxy-5'-(1'', 1'''-dimethylallyl)-6-prenylpinoembrin from *Dalea elegans*. *Pharm Biol*. 2003;41:171–4.
- Pharm IARC, Working Group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for Research on Cancer; World Health Organization. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Pharmaceuticals, v 100A. A review of human carcinogens Diethylstilbestrol, 175–218. Lyon, France. 2012.
- Professional and public relations committee of the DESAD (Diethylstilbestrol and Adenosis) project of the division of cancer control and rehabilitation. Exposure in utero to diethylstilbestrol and related synthetic hormones. Association with vaginal and cervical cancers and other abnormalities. *JAMA*. 1976;236:1107–9.
- Reynaud AH, Nygaard-Ostby B, Boygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol*. 2001;28:860–4.
- Rubio NA, Puia S, Toranzo S, Brusca MI. Invasión fúngica en tejido conectivo en pacientes con enfermedad gingival-periodontal. *Rev Iberoam Micol*. 2015;32:20–4.
- Shreaz S, Bhatia R, Khan N, Muralidhar S, Manzoor N, Khan LA. Influences of cinnamic aldehydes on H⁺ extrusion activity and ultrastructure of *Candida*. *J Med Microbiol*. 2013;62:232–40.
- Slayman CL, Kaminski P, Stetson D. Structure and function of fungal plasma-membrane APase. En: Kuhn PJ, Trinci APJ, Jung MJ, Goosey MW, Copping LG, editores. Biochemistry of cell walls and membranes in fungi. Berlin Heidelberg: Springer; 1990.
- Tang J, Li Q, Cheng B, Huang C, Chen K. Effects of diethylstilbestrol on the proliferation and tyrosine activity of cultured human melanocytes. *Biomed Rep*. 2015;3:499–502.
- Trinconi CT, Reimão JQ, Bonano VI, Espada CR. Topical tamoxifen in the therapy of cutaneous leishmaniasis. *Parasitology*. 2017;9:1–7. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182017000130>.
- White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:1704–13.
- White TC, Pfaller MA, Rinaldi MG, Smith J, Redding SW. Stable azole drug resistance associated with a substrain of *Candida albicans* from an HIV-infected patient. *Oral Dis*. 1997;3 Suppl 1:102–9.
- Yotis WW, Haan JN. Cytokinesis of *Candida albicans* by diethylstilbestrol. *J Appl Bacteriol*. 1978;44:225–32.
- Zhu L, Xiao L, Li W, Zhang Y, Han W, Zhu Y, et al. Human UDP-Glucuronosyltransferases 1A1, 1A3, 1A9, 2B4 and 2B7 are inhibited by diethylstilbestrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2016;119:505–11.